

Title	植物のクマリン特異的プレニル基転移酵素遺伝子に関する研究( Abstract_要旨 )
Author(s)	棟方, 涼介
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2016-03-23
URL	<a href="https://doi.org/10.14989/doctor.k19762">https://doi.org/10.14989/doctor.k19762</a>
Right	学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2017-03-22に公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

( 続紙 1 )

京都大学	博士（農学）	氏名	棟方 涼介
論文題目	植物のクマリン特異的プレニル基転移酵素遺伝子に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>植物は多種多様な二次代謝産物を生産する。中でもクマリン類は、1,500種以上の類縁体を擁する大きな芳香族有機化合物のグループであり、様々な環境ストレスに対する化学防御物質として機能する。このクマリン類の化学構造の多様性を高めている要因の一つにプレニル化があり、プレニル側鎖は構造多様性だけでなくクマリン類の生理活性の向上にも大きく寄与する。しかしながら、クマリン類を基質とするプレニル基転移酵素 (PT) 遺伝子に関しては、従来全くの未知であった。そこで本論文では、クマリン類に特徴的なPT遺伝子の単離及びその機能解析を行うことで、クマリン代謝において重要な生合成段階を司るプレニル化反応の解明を目的とした。</p>			
<p>1. ミカン科のレモン (<i>Citrus limon</i>) がクマリン類のゲラニル化体を高蓄積することから、プレニルドナー基質として炭素数10のゲラニルジリン酸 (GPP) に特異的なクマリン基質PTの遺伝子同定を行った。候補遺伝子<i>CIPT1</i>について、酵母発現系を用いた酵素機能解析、及びミカン科のヘンルーダを宿主とした<i>CIPT1</i>過剰発現体の代謝産物解析を行い、<i>CIPT1</i>はクマリン誘導体に対するゲラニル化酵素をコードすることを明らかにした。これはビタミンE生合成系の<i>VTE2-1</i>近縁メンバーとして、初めてのGPP特異的なPT遺伝子の同定例となった。</p>			
<p>2. フラノクマリン類 (FC) は、主に生物学的ストレスに対する防御物質として働くクマリンのサブグループの一つであり、クマリン骨格へのフラン環の結合様式により、リニア型とアンギュラー型に分類される。FCの生合成経路においては、初発反応を触媒するクマリン基質PTである<i>umbelliferone dimethylallyltransferase</i> (UDT) の基質特異性によって、FCがリニア型となるかアンギュラー型となるかが決定され、U6DT活性が高ければリニア型FCが、U8DT活性が高ければアンギュラー型FCがより多く生成する機構となっている。</p> <p>そこで本項では、両タイプのFCを有するセリ科植物のパースニップ (<i>Pastinaca sativa</i>) より、UDTの機能解析を行った。パースニップ葉のESTデータを元に単離した2つの候補遺伝子 <i>PsPT1</i> 及び<i>PsPT2</i> に対して、タバコ属植物である <i>Nicotiana benthamiana</i> 一過的発現系を用いた酵素機能解析を行い、<i>PsPT1</i> 及び<i>PsPT2</i> がそれぞれU6DT及びU8DTをコードすることを明らかにした。また、パースニップ葉由来の粗酵素が示すUDT活性の解析に加え、FC生産のエリシターであるジャスモン酸メチルを処理したパースニップ実生の代謝産物変動や、<i>PsPT1/2</i> の発現変動の解析により、パースニップにおいては<i>PsPT1</i> (U6DT) が主たるUDTとして機能していることを示唆した。</p>			

さらに、*Pastinaca* 属以外のセリ科植物についてもESTデータ解析や、粗酵素を用いたUDT活性測定を行うことで、*PsPT1/2*オルソログが両FCタイプを蓄積するセリ科の複数の属に保存されていること、ならびに植物種によって主に機能する*PsPT*パラログが異なることを示唆した。

3. FCを蓄積するクワ科のイチジク (*Ficus carica*)、及びミカン科のグレープフルーツ (*Citrus x paradisi*) より、新たにFC経路の初発酵素遺伝子*UDT*を同定し、セリ科由来の*UDT*とともに分子系統樹解析に供した。その結果、セリ科及びグレープフルーツ由来の*UDT*はビタミンE生合成系のVTE2-1から派生した一方で、イチジク由来の*UDT*はプラストキノン生合成系のVTE2-2から派生したことが示唆された。これにより、クワ科がミカン科やセリ科とは独立して*UDT*を獲得したことを示唆することで、植物界においてFCが複数の起源を有する可能性を示した。
4. 上記のPTは、いずれも炭素-炭素結合によってプレニル側鎖を結合させるC-PTであるが、セリ科やミカン科に属する植物には、炭素-酸素結合によってプレニル側鎖が結合したO-プレニル化FCを蓄積するものがある。クマリン類に限らず、これまで芳香族基質のO-プレニル化反応を司るPT (O-PT) 遺伝子は、植物において未解明であった。そこでO-PTの遺伝子同定に向けて、レモン及びセリ科の草本であるアシタバ (*Angelica keiskei*) より粗酵素を調製して、FC基質O-PT活性の酵素化学的諸性質を調べた。その結果、両植物種のO-PT活性ともに膜結合性及び二価カチオン要求性を示した。これらはいずれもC-PTと共通する特徴であったことから、セリ科及びミカン科のO-PTは既知のC-PTと一定のアミノ酸配列相同性を有している可能性を示唆した。
5. 前項の基盤情報より、既知のC-PTの相同性を利用したPCRクローニングを行い、アシタバよりO-PT候補遺伝子*AkPT1*を単離した。*N. benthamiana* を用いて一過的に発現させた組換え*AkPT1*が、実際にFCを基質とするO-PTであることを示し、見かけの*K<sub>m</sub>*値や基質特異性など、その酵素化学的諸性質を明らかにした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

植物の芳香族二次代謝産物の 1 グループであるクマリン類において、プレニル化反応は化学構造多様性及び生理活性発現の鍵となるが、クマリン基質PTの遺伝子は従前未知であった。本論文は、天然の生理活性物質であるクマリン誘導体の生合成経路において、骨格形成と多様化の両面から重要な役割を担うクマリン基質PT遺伝子を複数単離し、それらの酵素化学的・分子生物学的手法を用いた機能解析及び分子進化的解析を行った一連の研究をまとめたものである。本論文の評価すべき点は以下のとおりである。

1. ミカン科のレモンより、クマリンを特異的な基質とするゲラニル化酵素遺伝子 *CIPT1* を同定し、これがビタミンE生合成系の *VTE2-1* 近縁メンバーとしては初となる、GPP特異的なPT遺伝子であることを報告した。
2. フラノクマリン (FC) 生合成の初発酵素となるクマリン基質遺伝子として、リニアあるいはアンギュラーの各タイプに特異的な *U6DT* (*PsPT1*) 及び *U8DT* (*PsPT2*) を、セリ科植物のパスニップより同定した。さらに、セリ科の複数の属に *PsPT1/2* のオルソログが共に保存されていること、ならびにセリ科植物種によって主として機能する *PsPT* パラログが異なることを示唆した。
3. クワ科のイチジク、及びミカン科のグレープフルーツより、新たにクマリン基質プレニル基転移酵素遺伝子 (*UDT*) を複数同定した。これより、クワ科がセリ科やミカン科とは異なる分子進化様式により *UDT* を獲得したことを示唆し、植物界においてFCの起源は複数存在する可能性を示した。
4. セリ科のアシタバ、及びミカン科のレモンを材料に、FC基質 *O*-PT活性の酵素化学的性質 (膜結合性及び二価カチオン要求性) を明らかにし、この知見をもとにアシタバより植物で初めての芳香族基質 *O*-PT遺伝子 (*AkPT1*) を同定した。

以上のように、本論文は植物のクマリン代謝において重要な生合成段階を担うPTであるUDT、GPP特異的PT、及び*O*-PTをコードする遺伝子を明らかにした。また、植物のFC生産能の分子進化について遺伝子レベルでの知見を与えた。これらの成果は、植物生理学、代謝生化学、及び化学生態学の発展に寄与するところ大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成28年2月4日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)